

---

## **Estudando os diferentes componentes da dor crônica em ensaios pré-clínicos**

Sthefane Silva Santos \*, Naomi Caldas de Souza Santos \* e Max Denisson Maurício Viana \*\*

Dor aguda e dor crônica possuem diferenças que vão muito além da duração da dor. Pacientes com dor aguda têm atividade cerebral concentrada nas áreas relacionadas à transmissão e processamento da dor, enquanto pacientes com dor crônica apresentam uma sobreposição de atividade com regiões cerebrais que processam emoções, memória e cognição<sup>1</sup>. Dessa forma, a dor crônica cursa com alterações sensoriais, mas também de humor, cognição, memória, comportamento social e aprendizagem.

Diante da complexidade da dor, mensurá-la é um desafio para a ciência. Em estudos de laboratório, os pesquisadores utilizam estímulos como calor, frio, pressão, entre outros, para medir parâmetros como o aumento da sensibilidade à dor (também conhecida como hiperalgesia), ou dor causada por estímulos normalmente não dolorosos (alodinia), que são componentes importantes da dor crônica. A reprodução desses fenômenos em condições experimentais é possível pela utilização de modelos animais, chamados de estudos pré-clínicos, que permitem o estudo da dor de diversas origens como a dor neuropática, originada no tecido nervoso, e a inflamatória, originada a partir de uma inflamação tecidual.

Contudo, sabe-se que o controle adequado da dor crônica requer não apenas o uso de medicamentos que reduzem a dor, mas também abordagens voltadas à melhora dos componentes emocionais e psicológicos. Diante desse cenário, a pesquisa para o desenvolvimento de novos analgésicos deve incluir, além dos modelos pré-clínicos tradicionais que avaliam o componente sensorial da dor, modelos que permitam investigar os componentes afetivo, cognitivo e psicológico correlacionados à dor. Em ensaios pré-clínicos, compreender e mensurar esses diferentes componentes da dor é complexo e possui limitações. No entanto, é um passo fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais abrangentes para o manejo adequado da dor crônica.

A dor crônica pode cursar com condições psiquiátricas, sendo ansiedade e depressão as mais frequentes. Ambas podem ser avaliadas em modelos pré-clínicos denominados etológicos, capazes de gerar comportamentos mensuráveis nos roedores sugestivos de ansiedade e depressão e, por isso, permitem estudar o impacto de novos tratamentos sobre essas condições, sendo úteis também nos estudos da dor. Modelos etológicos se baseiam em comportamentos naturais dos animais, como a exploração/evitação de ambientes desconhecidos, pois os animais evitam instintivamente locais novos, iluminados, abertos e elevados. Entre os modelos etológicos que avaliam comportamentos tipo depressivos, os testes de suspensão de cauda e natação forçada estão entre os mais amplamente utilizados na pesquisa, e se baseiam no “desespero

comportamental". Já os testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado são utilizados para avaliação da ansiedade e se baseiam na exploração e evitação de lugares abertos inerentes aos roedores<sup>2</sup>.

O teste de natação forçada consiste em inserir o animal em um cilindro contendo água e observar a agitação ou imobilidade<sup>3</sup>. Esse parâmetro reflete que não há saída daquela situação e indica desistência de lutar/fugir, caracterizando o comportamento tipo depressivo. Importante pontuar que a temperatura da água e o tamanho do cilindro são importantes limitações do modelo. Assim, deve-se manter a temperatura rigorosamente controlada e o cilindro deve ter um tamanho adequado que não interfira no desempenho de natação ou imobilidade. Animais com dor apresentam aumento significativo do tempo de imobilidade. O comportamento tipo depressivo no teste de nado forçado foi observado em animais submetidos à indução de osteoartrite (modelo de dor inflamatória). Nos animais submetidos ao tratamento analgésico, foi observada redução dos parâmetros de dor concomitantemente à redução do tempo de imobilidade. Isso sugere que o alívio da dor também pode melhorar o comportamento tipo depressivo<sup>4</sup>.

O teste de suspensão de cauda consiste em suspender o animal pela cauda a uma altura considerável do chão e observar a agitação ou imobilidade, semelhante ao teste do nado forçado<sup>3</sup>. Tem como principal limitação a dificuldade em se manter o animal com a cauda suspensa durante o período de teste sem que se solte. A literatura mostra que esse teste é adequado para identificar e mensurar comportamento depressivo associado a dor crônica. Camundongos com dor neuropática ficam mais tempo imóveis quando suspensos pela cauda, sugerindo comportamento semelhante à depressão. Quando receberam tratamento antidepressivo, houve menor tempo de imobilidade e dos parâmetros de dor nestes animais<sup>5</sup>.

Assim, o teste do nado forçado e de suspensão de cauda são considerados modelos pré-clínicos de baixo custo e rápidos para a caracterização de parâmetros de depressão correlacionados à dor, sendo, portanto, úteis para avaliação de novos tratamentos para a dor crônica.

O campo aberto consiste numa arena cilíndrica ou quadrada, composta por uma área central desprotegida e áreas periféricas protegidas por parede, que permite a avaliação de diversos parâmetros de exploração do ambiente. Os animais submetidos ao teste do campo aberto apresentam comportamento semelhante à ansiedade quando permanecem perto das paredes e se locomovem mais na periferia. Quando os animais são tratados com substâncias ansiolíticas (que reduzem a ansiedade), tendem a passar mais tempo na área central indicando que a ansiedade foi reduzida<sup>6</sup>. A principal limitação do teste está no controle das variáveis do ambiente como iluminação, ruído e odores que podem interferir nos resultados. Contudo, é um teste de fácil execução. A utilidade desse teste para identificar ansiedade em modelos de dor crônica já foi demonstrada. Ratos com dor neuropática evitaram o centro da arena no teste do campo aberto,

um comportamento indicativo de ansiedade. Quando esses animais receberam tratamento com ansiolíticos apresentaram menos dor e passaram a se locomover na área central do campo aberto, indicando que o tratamento reduziu a ansiedade em paralelo a uma redução da dor<sup>7</sup>.

O labirinto em cruz elevado é um aparato em formato de cruz, elevado a 50 cm do chão, que possui dois braços abertos e dois braços fechados (protegidos por paredes), amplamente utilizados para medir o comportamento de ansiedade. No teste, os animais apresentam comportamento semelhante à ansiedade quando permanecem mais tempo nos braços fechados, onde se sentem seguros. Animais tratados com ansiolíticos tendem a se deslocar e passar mais tempo nos braços abertos<sup>8</sup>. A literatura mostra que a utilização do teste do labirinto em cruz elevado para mensurar a ansiedade em animais com dor tem resultados contraditórios. Há estudos que demonstraram aumento do comportamento sugestivo de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado em animais com dor<sup>9</sup>. Entretanto, nem sempre isso é visto. Animais com dor neuropática apresentaram comportamento semelhante à ansiedade no teste do campo aberto, mas não apresentaram esse comportamento no teste do labirinto em cruz elevado<sup>7</sup>. Embora o labirinto em cruz elevado seja um dos modelos mais utilizados na pesquisa sobre ansiedade, em função de sua simplicidade de execução e análise, sua utilidade para o estudo da ansiedade associada a dor crônica ainda precisa ser comprovada.

Os estudos de ansiedade e depressão associados à dor crônica podem incluir também modelos de comportamento condicionado. Eles utilizam um método de aprendizado, baseado em recompensas ou punições, que cria uma associação entre um comportamento e uma consequência (seja negativa ou positiva) desse comportamento<sup>10</sup>.

Um teste de comportamento condicionado útil para estudar a ansiedade associada à dor é o teste de condicionamento do medo, que se baseia na aprendizagem e memória<sup>11</sup>. Consiste na ambientação do animal a uma caixa teste, com sua transferência para uma segunda caixa com padrões diferentes de parede, piso, intensidade de luz ou som de fundo, onde são expostos a um pequeno choque elétrico. Os animais aprendem a "ter medo" desta segunda caixa e, quando expostos novamente a ela, mesmo na ausência do choque, apresentam uma resposta defensiva caracterizada pelo congelamento, que é uma resposta natural frente ao perigo. O tempo de congelamento dos animais é mensurado, e considerado um indicativo de ansiedade. Nesse teste, animais com dor neuropática apresentam comportamento semelhante à ansiedade, pois apresentam aumento do tempo de congelamento em comparação aos animais saudáveis<sup>12</sup>. Tais modelos de condicionamento estão relacionados à memória traumática e fobias. Isso é importante porque em pacientes com dor crônica o comportamento de congelamento ocorre frente à ameaça social, também observada na ansiedade<sup>13</sup>.

Uma outra abordagem pré-clínica condicionada que pode ser utilizada nos estudos de dor crônica é o teste de reconhecimento de objetos, que permite avaliar parâmetros relacionados à memória, ou seja, um aspecto cognitivo.

O teste é baseado na tendência dos animais a explorarem mais objetos novos em comparação a objetos já familiarizados. O protocolo consiste em duas fases: na primeira, denominada de sessão de treino, o animal é inserido na presença de dois objetos iguais para se familiarizar. Após essa sessão, o animal é retirado do local para o período de retenção das informações, que varia de acordo com o tipo de memória (de curto ou de longo prazo) que se deseja estudar. Em seguida, na fase de teste, o animal é exposto a dois objetos: um já familiarizado na primeira fase e um objeto novo, registrando-se o tempo que o animal explora cada objeto<sup>14</sup>. O teste de reconhecimento de objetos já foi utilizado nos estudos da dor crônica<sup>15,16</sup>. Foi observado que animais com dor neuropática desenvolvem comportamento semelhante à perda de memória. A exploração de objetos novos é menor nos animais com dor neuropática do que em animais saudáveis, sugerindo que há perda da memória de reconhecimento nos ratos com dor neuropática. Esse modelo é relevante na área da dor, porque os déficits cognitivos também são relatados em pacientes com dor crônica.

Além de ansiedade, depressão e alterações cognitivas, o processamento de recompensas também pode ser alterado em estados de dor crônica. Já foi demonstrado que pacientes com dor crônica desenvolvem anedonia<sup>17</sup>, que é a perda da capacidade de sentir prazer em atividades cotidianas normalmente consideradas prazerosas, como comprar uma roupa nova ou comer um doce. Dessa forma, modelos experimentais que avaliam a anedonia, como o teste de preferência pela sacarose e o paradigma de preferência de lugar condicionado, podem ser utilizados nos estudos de dor. O teste da sacarose consiste em oferecer dois bebedouros ao roedor, um contendo água e outro contendo sacarose, com opção de escolha para consumo. Os animais apresentam preferência natural por bebidas doces e palatáveis, de modo que o consumo da bebida com sacarose é normalmente maior. Ao final do teste o consumo é contabilizado e a falta de preferência pela bebida doce é um indicativo de anedonia<sup>18</sup>. O teste de paradigma de preferência de lugar condicionado consiste em duas cabines distintas conectadas por uma intermediária neutra. Em uma cabine o animal recebe um analgésico para alívio da dor (recompensa) e na outra não. Com o treinamento o animal passa a exibir preferência pela cabine onde recebe a recompensa, e exibe o comportamento condicionado de ficar mais tempo nessa cabine. Quanto maior o tempo na cabine preferida, maior o comportamento de busca de recompensa e menor a anedonia<sup>19</sup>. Já foi demonstrado que animais com dor neuropática desenvolvem comportamento semelhante à anedonia. No teste da sacarose e no de preferência de lugar, ratos com dor neuropática apresentaram redução do consumo de sacarose e uma preferência pelo local não associado com o alívio da dor. Isso demonstra que animais com dor crônica não estão motivados a buscar experiências prazerosas e nem recompensadoras. Após o tratamento da neuropatia, foi observada preferência pela sacarose e pelo local associado com o alívio da dor<sup>20</sup>.

É possível concluir que os inúmeros testes e modelos aqui descritos são ferramentas úteis no estudo dos componentes da dor, embora apresentem desafios inerentes, sobretudo a dificuldade de interpretação dos dados em função da complexidade dos comportamentos analisados. Ainda assim, a pesquisa contínua nessa área é fundamental para melhor compreender e gerenciar as condições subjacentes à dor crônica, e dessa forma contribuir para avançar no tratamento e melhorar o manejo da dor crônica.

#### Referências:

1. Hashmi JA, Baliki MN, Huang L, et al. Shape shifting pain: chronification of back pain shifts brain representation from nociceptive to emotional circuits. *Brain*. 2013;136(9):2751. doi:10.1093/brain/awt211
2. Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 2013;35(Supl.2):S101-S111.
3. Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S. Rodent Models of Depression: Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;14(1). doi:10.1002/0471142301.ns0810as14
4. Kędziora M, Boccella S, Marabese I, et al. A inibição da degradação da anandamida reduz a dor e restaura os níveis de LTP e monoamina no hipocampo de ratos através do receptor CB 1 após osteoartrite. *Neuropharmacology*. 2023;222:109304. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109304
5. Kremer M, Becker LJ, Barrot M, Yalcin I. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *Eur J Neurosci*. 2021;53(1):236-270. doi:10.1111/ejn.14686
6. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: A critical review. *Psychol Bull*. 1976;83(3):482-504. doi:10.1037/0033-2909.83.3.482
7. Shyu BC, He AB, Yu YH, Huang ACW. Tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors but not anticonvulsants ameliorate pain, anxiety, and depression symptoms in an animal model of central post-stroke pain. *Mol Pain*. 2021;17:17448069211063351. doi:10.1177/17448069211063351
8. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1916:69-74. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2\_4
9. Spinieli RL, Cazusa RA, Sales AJ, et al. Persistent inflammatory pain is linked with anxiety-like behaviors, increased blood corticosterone, and reduced global DNA methylation in the rat amygdala. *Mol Pain*. 2022;18:17448069221121307. doi:10.1177/17448069221121307

- 
10. Kirlic N, Young J, Aupperle RL. Animal to Human Translational Paradigms Relevant for Approach Avoidance Conflict Decision Making. *Behav Res Ther.* 2017;96:14-29. doi:10.1016/j.brat.2017.04.010
  11. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice. *J Vis Exp JoVE.* 2014;(85):50871. doi:10.3791/50871
  12. Cardenas A, Blanca M, Dimitrov E. Persistent pain intensifies recall of consolidated fear memories. *Neurobiol Stress.* 2019;10:100163. doi:10.1016/j.ynstr.2019.100163
  13. Karos K, Meulders A, Leyssen T, Vlaeyen JW. Freeze-like responses to pain in humans and its modulation by social context. *PeerJ.* 2020;8:e10094. doi:10.7717/peerj.10094
  14. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory." *Nat Protoc.* 2006;1(3):1306-1311. doi:10.1038/nprot.2006.205
  15. Moriarty O, Gorman CL, McGowan F, et al. Impaired recognition memory and cognitive flexibility in the rat L5-L6 spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Scand J Pain.* 2016;10:61-73. doi:10.1016/j.sjpain.2015.09.008
  16. Phelps CE, Navratilova E, Porreca F. Chronic Pain Produces Reversible Memory Deficits That Depend on Task Difficulty in Rats. *J Pain.* 2021;22(11):1467-1476. doi:10.1016/j.jpain.2021.04.016
  17. Garland EL, Trøstheim M, Eikemo M, Ernst G, Leknes S. Anhedonia in chronic pain and prescription opioid misuse. *Psychol Med.* 2020;50(12):1977-1988. doi:10.1017/S0033291719002010
  18. Primo MJ, Fonseca-Rodrigues D, Almeida A, Teixeira PM, Pinto-Ribeiro F. Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2023;77:80-92. doi:10.1016/j.euroneuro.2023.08.496
  19. Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl).* 2000;153(1):31-43. doi:10.1007/s002130000569
  20. Wang XY, Jia WB, Xu X, et al. A glutamatergic DRN-VTA pathway modulates neuropathic pain and comorbid anhedonia-like behavior in mice. *Nat Commun.* 2023;14. doi:10.1038/s41467-023-40860-3

---

\* Aluna de graduação – iniciação científica/extensão - UFBA

\*\* Professor da Faculdade de Farmácia da UFBA